

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-345465
 (43)Date of publication of application : 03.12.2002

(51)Int.CI. C12N 15/09
 C12M 1/00

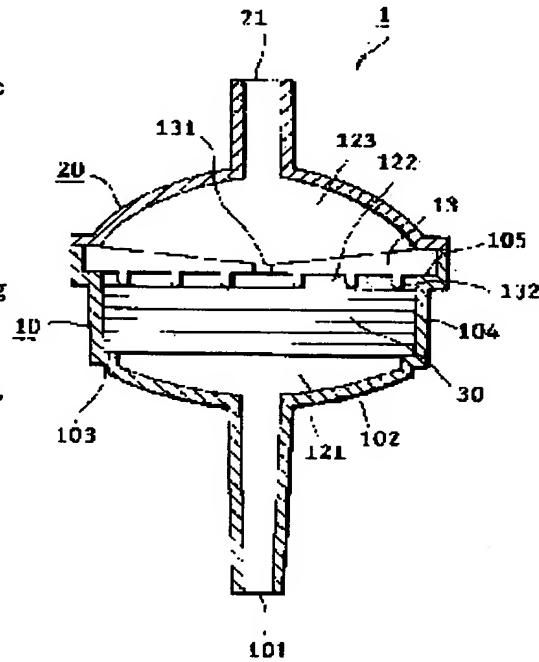
(21)Application number : 2001-156042 (71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD
 (22)Date of filing : 24.05.2001 (72)Inventor : MORI TOSHIHIRO
 MAKINO YOSHIHIKO

(54) UNIT FOR PURIFYING NUCLEIC ACID AND METHOD FOR PURIFYING THE NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a unit for purifying a nucleic acid, capable of separating the nucleic acid from a sample solution containing the nucleic acid by only using procedures of depressurizing and pressurizing the solution, and to provide a method for purifying the nucleic acid by using the unit.

SOLUTION: The unit for purifying the nucleic acid comprises (a) a solid phase which is capable of adsorbing and desorbing the nucleic acid, (b) a container which receives the solid phase capable of adsorbing and desorbing the nucleic acid and has at least two openings, and (c) a pressure-difference generator which is connected to one of the openings of the container. The method for purifying the nucleic acid comprises using this unit.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-345465

(P2002-345465A)

(43)公開日 平成14年12月3日 (2002.12.3)

(51)Int.Cl.
C 12 N 15/09
C 12 M 1/00

識別記号

F I
C 12 M 1/00
C 12 N 15/00

テマコト(参考)
A 4 B 0 2 4
A 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2001-156042(P2001-156042)

(22)出願日 平成13年5月24日 (2001.5.24)

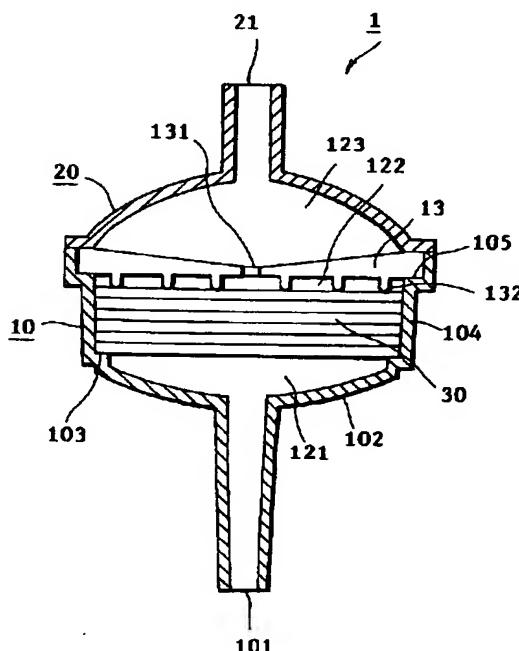
(71)出願人 000005201
富士写真フィルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地
(72)発明者 森 寿弘
埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内
(72)発明者 牧野 快彦
埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内
(74)代理人 100085109
弁理士 田中 政浩
Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 HA20
4B029 AA23

(54)【発明の名称】 核酸精製ユニット及び核酸精製方法

(57)【要約】

【課題】 減圧及び加圧操作だけで核酸を含む試料溶液から核酸を分離できる核酸精製ユニット及びそのユニットを用いた核酸の精製方法を提供することにある。

【解決手段】 上記課題は、(a)核酸の吸着及び脱着が可能な固相と、(b)この核酸の吸着及び脱着が可能な固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器と、及び(c)前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置とを含む核酸精製ユニット、及びその精製ユニットを用いた核酸精製方法によって達成される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 核酸の吸着及び脱着が可能な固相、
 (b) 前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び
 (c) 前記容器の一の開口に結合された、圧力差発生装置、を含む核酸精製ユニット。

【請求項2】 前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相がガラス繊維濾紙である請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項3】 前記圧力差発生装置が、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている、請求項1又は請求項2に記載の核酸精製ユニット。

【請求項4】 前記圧力差発生装置が注射器である請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項5】 前記圧力差発生装置がビベッタである請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項6】 前記圧力差発生装置がペリスタポンプである請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項7】 請求項1に記載の核酸精製ユニットを用いる以下の工程を含む核酸精製方法。
 (a) 前記核酸精製ユニットの一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入する工程、
 (b) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を減圧状態にして前記核酸を含む試料溶液を吸引し、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に接触させる工程、
 (c) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を加圧状態にし、前記吸引された核酸を含む試料溶液を前記容器外に排出する工程、
 (d) 前記核酸精製ユニットの一の開口を核酸洗浄バッファ溶液中に挿入する工程、
 (e) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を減圧状態にして前記核酸洗浄バッファ溶液を吸引し、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に接触させる工程、
 (f) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を加圧状態にし、前記吸引された核酸洗浄バッファ溶液を前記容器外に排出する工程、
 (g) 前記核酸精製ユニットの一の開口を、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめる液中に挿入する工程、
 (h) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を減圧状態にして、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめる液を吸引し、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に接触させる工程、及び
 (i) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前

10 [0002]

【従来の技術】核酸は、様々な分野で、種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現における種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

30 [0005] 〔0005〕従来一般的に行われている精製方法では、遠心分離操作が含まれている。例えば特公平7-51065、特表平2000-505295等に開示されている方法では、シリカ粒子に代表される、核酸が結合可能な固相に核酸を含む試料液を接触させて当該固相に核酸を結合させ、次いで遠心分離により核酸が結合した固相を分離している。

【0006】しかし、遠心分離操作には大きな問題点がある。即ち、遠心分離機にかける必要があるため、精製操作を連続的な工程に組み込むことができない。また、通常試料を移し替えるので、試料が汚染される機会が増える。

【0007】また、クロマトグラフィ法を利用した精製方法も公開されているが(特開2000-93171)、この方法では、独立した液体吸引器具を使用して、液体の吸入及びカラムへの吐出操作が必要で、操作が煩雑となる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、遠心分離操作を必要とせず、また操作が煩雑なクロマトグラフィ法と異なり、減圧及び加圧操作だけで核酸を含む試

3
料溶液から核酸を分離できる核酸精製ユニット及びそのユニットを用いた核酸の精製方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の課題は、(a)核酸の吸着及び脱着が可能な固相、(b)この核酸の吸着及び脱着が可能な固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c)前記容器の一の開口に結合された、圧力差発生装置を含む核酸精製ユニット、及びその精製ユニットを用い、減圧及び加圧操作による核酸を含む試料溶液の吸引及び排出操作と、それに続く核酸洗浄バッファ溶液の吸引及び排出操作と、それに続く核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液の吸引及び排出操作を含む核酸精製方法により達成された。ここで、本発明において「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

【0010】

【発明の実施の形態】核酸の吸着及び脱着が可能な固相(以下、「固相」と記す)としては、シリカゲル、ガラス、アルミナ、ゼオライト、二酸化チタン、二酸化ジルコニアム、金属酸化物及び/又は混合金属酸化物等からなる多孔性又は非多孔性の無機材料が挙げられる。これらの中ではガラス、特にガラス纖維濾紙が好ましい。ガラス纖維濾紙としては、ワットマン社製のG F/A、G F/B、G F/C、G F/D、あるいはアドバンテック社の製品等が使用できる。この際、これらのガラス纖維濾紙の密度、保留粒子径、ガラス纖維の太さ等には無関係に使用可能である。

【0011】この固相を収容する容器の材料に特別な限はない、固相が収容でき、かつ少なくとも2個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。例えば、ポリスチレン、ポリメタアクリル酸エチル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチル、ナイロン、ポリカーボネート等の透明あるいは不透明の樹脂を用いるのが好ましい。

【0012】以下、固相としてガラス纖維濾紙を使用した態様を例にして、本発明について詳細に説明する。

【0013】容器は、通常、ガラス纖維濾紙を収容する本体と、蓋体に分けた態様で作製され、いずれにも少なくとも1個の開口が設けられている。一方は核酸を含有する試料溶液、核酸洗浄バッファ溶液及び核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液(以下、「試料溶液等」と記す。)の入口及び出口として使用され、他方は容器内を減圧又は加圧状態にせしめうる圧力差発生装置に接続される。本体の形状に特に限定はないが、製造が容易で、試料溶液等がガラス纖維濾紙の全面に拡散し易くするには、断面を円形にすることが好ましい。断面を四角形にすることも、ガラス纖維濾紙の裁断屑を発生させないために好ましい。

【0014】上記蓋は、圧力差発生装置によって容器内部を減圧及び加圧状態にできるように本体に接合されている必要があるが、この状態が達成できれば、接合方法は任意に選択できる。例えば、接着剤の使用、ねじ込み、はめ込み、ネジ止め、超音波加熱による融着等が挙げられる。

【0015】容器の内容積は処理すべき試料溶液の量のみによって決められるが、通常、収容するガラス纖維濾紙の体積で表す。即ち、厚さが約1mmで直径が約2mm~20mmのガラス纖維濾紙を1枚~6枚程度収容する大きさとすることが好ましい。

【0016】ガラス纖維濾紙の端面は、試料溶液等が通過しない程度に、容器の内壁面に密着させることができることが好ましい。

【0017】試料溶液等の入り口に使用される開口に対向するガラス纖維濾紙の下は、容器の内壁に密着させずに空間を設け、試料溶液等がガラス纖維濾紙の全面にできるだけ均等に拡散する構造にする。

【0018】他の一の開口、即ち圧力差発生装置に結合される開口に対向するガラス纖維濾紙の上には、ほぼ中央に穴を穿った部材を設けることが好ましい。この部材は、ガラス纖維濾紙を押さえると共に、試料溶液等を効率よく排出する効果を有するものであり、液が中央の穴に集まる様に、漏斗状あるいはねじ状等の斜面を有する形状にすることが好ましい。この穴の大きさ、斜面の角度、部材の厚さは、処理する試料溶液等の量やガラス纖維濾紙を収容する容器の大きさ等を考慮して、当業者が適宜定めることができる。この部材と当該開口の間に、オーバーフローした試料溶液等を溜めて、圧力差発生装置内に吸引されることを防ぐための空間を設けることが好ましい。この空間の大きさも当業者が適宜選択することができる。なお、核酸を効率良く集めるためには、ガラス纖維濾紙の全体が浸る以上の量の核酸を含む試料溶液を吸引することが好ましい。

【0019】また、吸引している開口の真下の部分にのみ試料溶液等が集中することを防いで、試料溶液等がガラス纖維濾紙内を比較的均一に通過できるようにするため、ガラス纖維濾紙とこの部材の間にも空間を設けることが好ましい。このためには、当該部材からガラス纖維濾紙に向けて複数の突起物を設けることが好ましい。突起物の大きさや数は当業者が適宜選択することができるが、空間を保持しながらガラス纖維濾紙の開口面積をできる限り大きく保つことが好ましい。

【0020】なお、容器に3以上の開口を設けた場合には、減圧及び加圧操作に伴う液の吸引及び排出を可能にすべく、余分の開口を一時的に封鎖する必要があることはいうまでもない。

【0021】圧力差発生装置は、まずガラス纖維濾紙を収容した容器内を減圧にして核酸を含む試料溶液を吸引する。圧力差発生装置としては、注射器、ビベッタ、あ

るいはペリスタポンプのような吸引及び加圧が可能なポンプ等が挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ビベッタは片手操作が容易にできるという利点を有する。

【0022】次に、上記核酸精製ユニットを使用した、核酸の精製方法について説明する。本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液等から調製された溶液が対照となる。

【0023】最初にこれらの検体を核酸溶解バッファ溶液で処理する。本発明で使用する核酸溶解バッファは主剤、緩衝剤、必要に応じて界面活性剤、及びプロテアーゼK等の細胞膜を溶解する試薬を含む水溶液である。主剤としては塩化グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン、過塩素酸ナトリウム、沃化ナトリウム等が使用でき、緩衝剤としては、Tris、EDTAが、界面活性剤としてはTriton-X100等が使用できる。これらの内では、塩化グアニジン及びTrisが好ましい。緩衝剤の好ましい濃度は10～100mM、界面活性剤の好ましい濃度は0.1～10%である。

【0024】このように調製された核酸を含む試料溶液中に、上記の、本発明に係る核酸精製ユニットの一の開口を挿入する。次いで他の一の開口に接続された圧力差発生装置を用いて精製ユニットの内部を減圧にして試料溶液を容器内に吸入する。この操作により、試料溶液が固相と接触して試料溶液中にある核酸が固相に吸着する。この際に、固相のほぼ全体と接触する量の試料溶液を吸引することが好ましいが、圧力差発生装置内に吸引すると装置を汚染するので、適量に調整する。

【0025】適量の試料溶液を吸引後、圧力差発生装置を用いてユニットの容器内を加圧して、吸引した液を排出する。この操作までに間隔を開ける必要はなく、吸引後直ちに排出してもよい。

【0026】次に、上記と同様の減圧-加圧操作で核酸洗浄バッファ溶液を容器内に吸引し、これから排出して容器内部を洗浄する。この溶液は容器内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒にガラス繊維濾紙に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。従って、ガラス繊維濾紙から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなり、主剤としてはメチルアルコール、エチルアルコール、ブチルアルコール、アセトン等の約10～90%（好ましくは約50～90%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エチルアルコール、Tris及びTriton-X100を含む溶液が好ましい。Tris及びTriton-X100

の好ましい濃度は、それぞれ10～100mM、及び0.1～10%である。

【0027】次に、ガラス繊維濾紙に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液を、上記と同様の減圧-加圧操作によって容器内部に導入し、容器から排出する。この排出液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に焼く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ鎖鎖反応）による核酸の増幅に提供する。

【0028】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0029】

【実施例】実施例1 核酸精製ユニット

図1は、本発明に係る核酸精製ユニットの断面図である。但し圧力差発生装置は図示していない。固相を収容する容器1は、本体10と蓋20から成り、透明なポリスチレンで形成されている。本体10はガラス繊維濾紙30としてGF/D（ワットマン社製）を6枚収容している。また、試料溶液等を吸引する開口101を有する。開口から続いている底面102は漏斗状に形成され、ガラス繊維濾紙30との間に空間121が設けられている。ガラス繊維濾紙30を支えて空間121を保つために、底面102と一体となった枠103が設けられている。

【0030】本体は、内径が20.1mm、深さが5.9mm、底面102から開口101までの長さは約70mmである。また、内蔵されているガラス繊維濾紙30の直径は20.0mm、一枚の厚さは0.91mmである。

【0031】図1において、ガラス繊維濾紙の上部には漏斗状の押さえ部材13が設けられている。押さえ部材13の中央には穴131があり、かつ下方に一群の突起132が設けられ、ガラス繊維濾紙30との間に空間122が設けられている。ガラス繊維濾紙30と本体10の壁104の間から試料溶液等が漏れにくい様に、壁104の上部の直径はガラス繊維濾紙の直径より大きく作成され、段差105の上に押さえ部材13の端が乗っている。

【0032】蓋20は本体10と超音波加熱により接合されている。蓋20のほぼ中央部には、圧力差発生装置を結合する開口21が設けられている。蓋20と押さえ部材13の間には、穴131から流出する試料溶液等を保持する空間123が設けられている。空間123の容積は約0.1mlである。

【0033】実施例2 実施例1の核酸精製ユニットを使用した核酸の精製

市販の採血管を用いて、ヒト全血を2ml採血した。この全血に、表1の組成を有する核酸溶解バッファ溶液2mlを添加し、60℃で10分間インキュベートした。

【0034】

7
表1 核酸溶解バッファ溶液の組成

塩化グアニジン (ライフテクノロジー社製)	382 g
Tris (ライフテクノロジー社製)	12.1 g
Triton-X100 (ICN社製)	10 g
プロテアーゼK	20 μl
2回蒸留水	1000 ml

【0035】インキュベート後、実施例1に記載した核酸精製ユニットの開口101を液中に挿入し、開口21に、テルモ社製の5mlの注射器を接続して(図示せず)吸引した。この際、吸引速度に限定は不要なので、液が注射器内に流入しないように目視で調節した。ついで、開口21に接続されたままの注射器を用いて加圧し、液を排出した。後述する通り、この操作により、ガラス繊維濾紙に核酸が吸着された。

【0036】排出後直ちに、表2の組成を有する核酸洗浄バッファ溶液中に開口101を挿入し、同様の減圧-加圧操作によってユニット内部を洗浄した。

【0037】表2 核酸洗浄バッファ溶液の組成

10 mM Tris-HCl 70% エタノール

【0038】この洗浄は、ガラス繊維濾紙に吸着した不純物及び容器内部の核酸を含む試料溶液の残留物を洗浄*

表3 吸光度の測定

試料番号	核酸量	吸光度の比率 (260 nm / 280 nm)
1	121 μg	1.865
2	108 μg	1.932
3 (バッフィーコート)	291 μg	1.899

【0042】実施例4 PCRによる增幅

実施例2で回収した液を用いて、PCRによる核酸の増幅

*するための操作であり、ガラス繊維濾紙に吸着された核酸にはなんら影響を与えない。

【0039】洗浄液の排出後直ちに、2mlの精製蒸留水を用いて同様の吸引-排出操作を行い、この排出液を回収した。この操作により、ガラス繊維濾紙に吸着した核酸が精製蒸留水中に脱着し、回収された。

【0040】実施例3 核酸の回収量の定量

実施例2で回収した液の吸光度を測定することにより、液中に含まれる核酸の量と純度を定量した。当業者に公知の方法に従い、波長260 nmにおける吸光度により核酸の量を定量し、波長260 nm及び280 nmにおける吸光度の比率から純度を決定した。なお、この比率が1.8以上であれば純度は良好であると判断される。

20 测定結果を表3に示す。

【0041】

表4 液組成

回収液	2 μl
精製水	36.5 μl
PCRバッファ10倍希釈液	5 μl
2.5 mM dNTP	4 μl
Taq F P	0.5 μl
プライマー	2 μl

(P53エクソン6を増幅するように設計)

【0044】この液を94°Cで30秒間変性した後、65°Cで30秒間アニーリングし、72°Cで1分間伸長反応を行った。この工程を30回繰り返した。こうして得られた液と、ポジティブコントロールとしてクロントック社製のHuman DNAと、及びネガティブコントロールとして精製水を用い、1.5%アガロースゲルにて1時間、定法に従って電気泳動を実施した。結果を図2に示す。図2において、最上段はマーカーの、二段目はポジティブコントロールの、三段目はサンプル1の、そして四段目はサンプル2の電気泳動の結果である。また、何も現れていない最下段はネガティブコントロールの結果である。

【0045】実施例3及び実施例4の結果から、実施例

2で得た回収液中には実用的な量及び純度の核酸が含まれていたことが判る。

40 【0046】

【発明の効果】本発明の核酸精製ユニット及び核酸精製方法により、圧力差を利用した試料溶液等の吸引及び排出という簡単な操作で、血液等から実用的な量及び純度の核酸を得ることができる。本発明の方法は、特に連続工程中に容易に組み込むことができるという利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明になる核酸精製ユニットの一例である。但し、開口21に結合されるべき圧力差発生装置は図示していない。

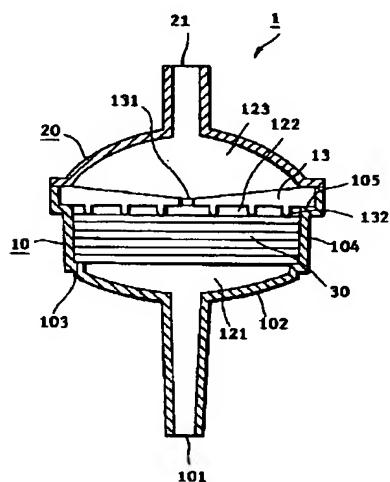
【図2】 図2は、本発明の核酸精製ユニットを使用し、本発明の核酸精製方法によって回収した核酸をPCRによって増幅した試料の、電気泳動の結果である。

【符号の説明】

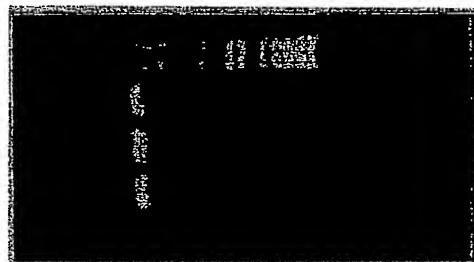
1 …容器
10 …本体
101 …開口
102 …底面
103 …枠
104 …壁

*105 …段差
121 …空間
122 …空間
123 …空間
13 …押さえ部材
131 …穴
132 …突起
20 …蓋
21 …開口
*10 30 …ガラス繊維滤紙

【図1】



【図2】



BEST AVAILABLE COPY